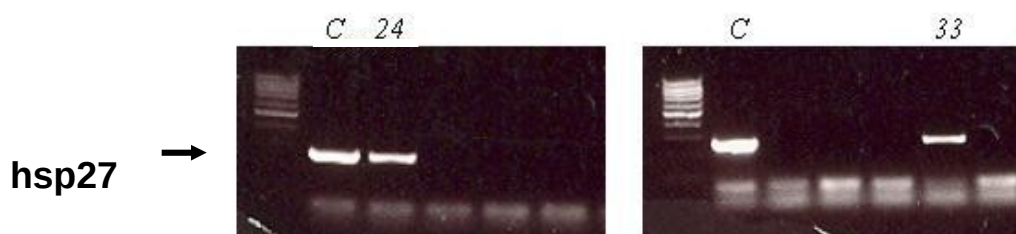


## OTKA zárójelentés

(A 2009. jan.1.-2010.dec.31. között végzett munkáról)

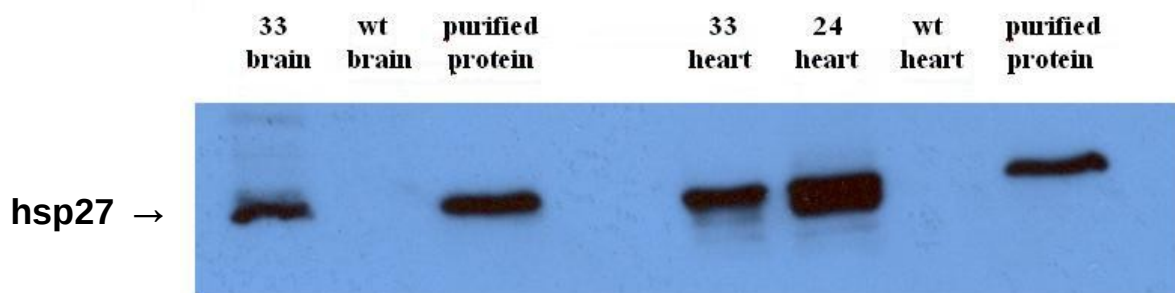
A Rac1 fehérje túlermelése transzgenikus egerekben a szivizomszövet apoptózisához, majd ezt követően szöveti átrendeződéséhez (remodeling), végül a szivizomzat fibrózisához és pitvari fibrilláció (AF) kialakulásához vezet. Az eredeti munkaterv szerint a hsp27 a szivizomszövet apoptózisában és szöveti átrendeződésében játszott szerepét Rac1xhsp27 kettős transzgenikus egerekben terveztük tanulmányozni. Az első periodusban előállítottunk humán hsp27 fehérjét túlermelő transzgenikus egértörzset. Az utódok genotipusát PCR- reakcióval határoztuk meg **(1. ábra)**.

Két transzgenikus utódot azonosítottunk, amelyből további keresztezések révén transzgenikus egérvonalakat alakítottunk ki (line 24 és line 33).

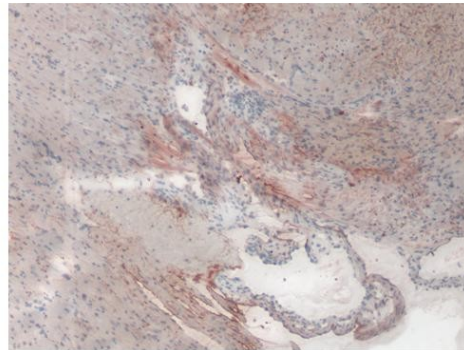


**1. ábra.** Hsp27 transzgenikus utódok kimutatása PCR reakcióval.(C: plazmid kontrol)

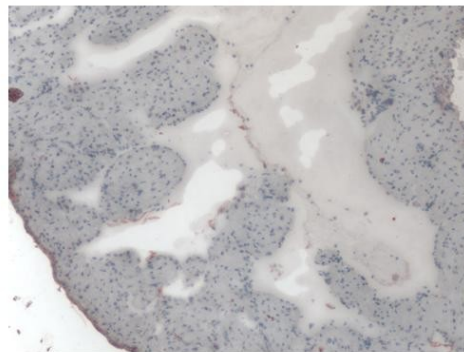
Western blot technikával és immunhisztokémiai festéssel kimutattuk, hogy a humán hsp27 fehérje túlermelődik mindkét transzgenikus egértörzs szívében (line 33 és line 24) **(2. A. és B. ábra)**.



**2. ábra. A)** A humán hsp27 fehérje kifejeződésének kimutatása western blottal transzgenikus egérvonalakból.



TG

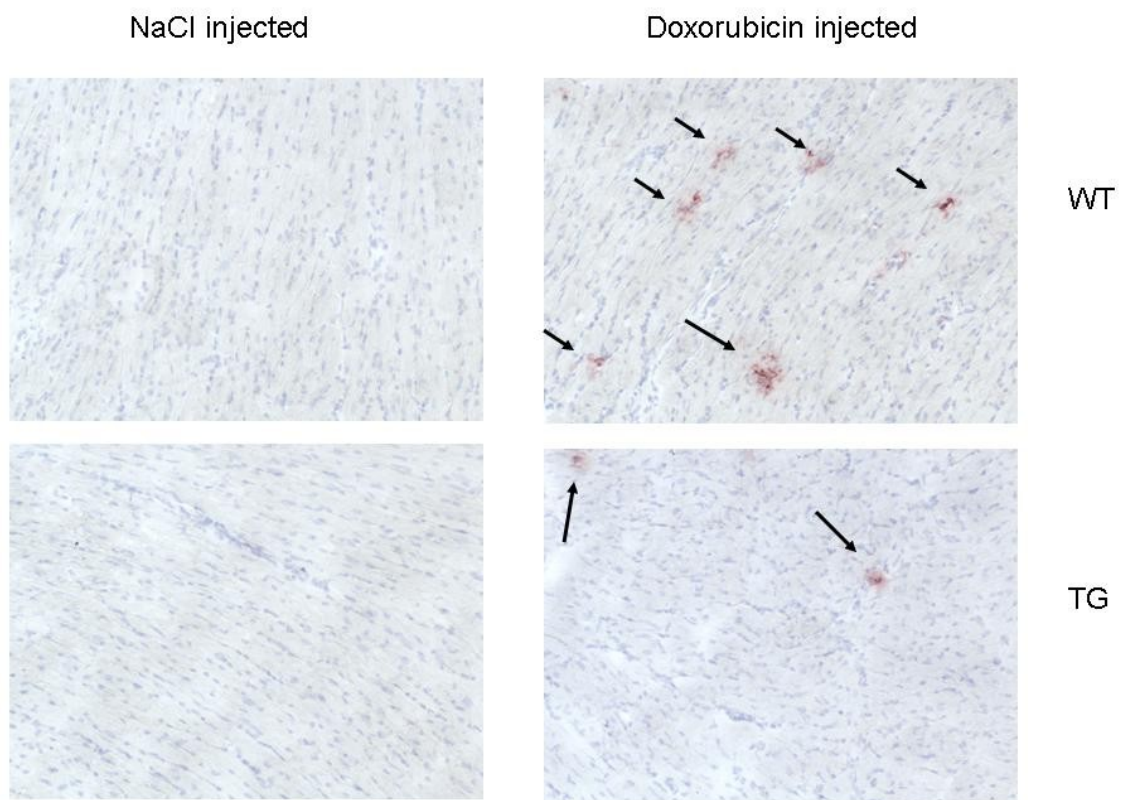


WT

**B).** A humán hsp27 fehérje kifejeződésének kimutatása transzgenikus egér szívizomszövetéből immunhisztokémiával. (A barnára színeződött területek a hsp27 fehérje jelenlétére utalnak).

Sajnos a Rac1 fehérjét túltermelő transzgenikus egértörzset ismételt kérésünkre, még a külföldi partner közbenjárásával sem sikerült beszereznünk. Alternatív megoldásként a szívizomelhalás (apoptosis) és fibrózis (cardiac remodeling) tanulmányozására a doxorubicint alkalmaztuk. A doxorubicin hatékony tumor-ellenes szer, kiterjedt klinikai alkalmazását azonban a szívizomzatra kifejtett toxikus hatása akadályozza. Huang és munkatársai kimutatták, hogy a doxorubicin 25mg/kg dózisban az injektált egerek szívében apoptózist és ezt követően, a szöveti átrendeződés eredményeképpen fibrózist indukál (Liu et al. 2007) . Ezért jelenleg, mi is a doxorubicint alkalmazzuk az apoptózis

kiváltására és ebben a rendszerben vizsgáljuk a hsp27 anti-apoptotikus, kardioprotektív szerepét. Ezen vizsgálatok a második periódusban kezdődtek el (2010) és jelenleg is folyamatban vannak. Megállapítottuk, hogy a doxorubicinnel (25 mg/kg) kezelt vad típusu egerek szívében nagyszámú és kiterjedt elhalásos gócok jönnek létre, míg a kezelt hsp27 transzgenikus egerek szívében az elhalásos gócok száma lényegesen kevesebb és kisebb területre korlátozódik; tehát a hsp27 valóban védi a szívmusclesejteket a doxorubicin okozta károsodásoktól (3. ábra).

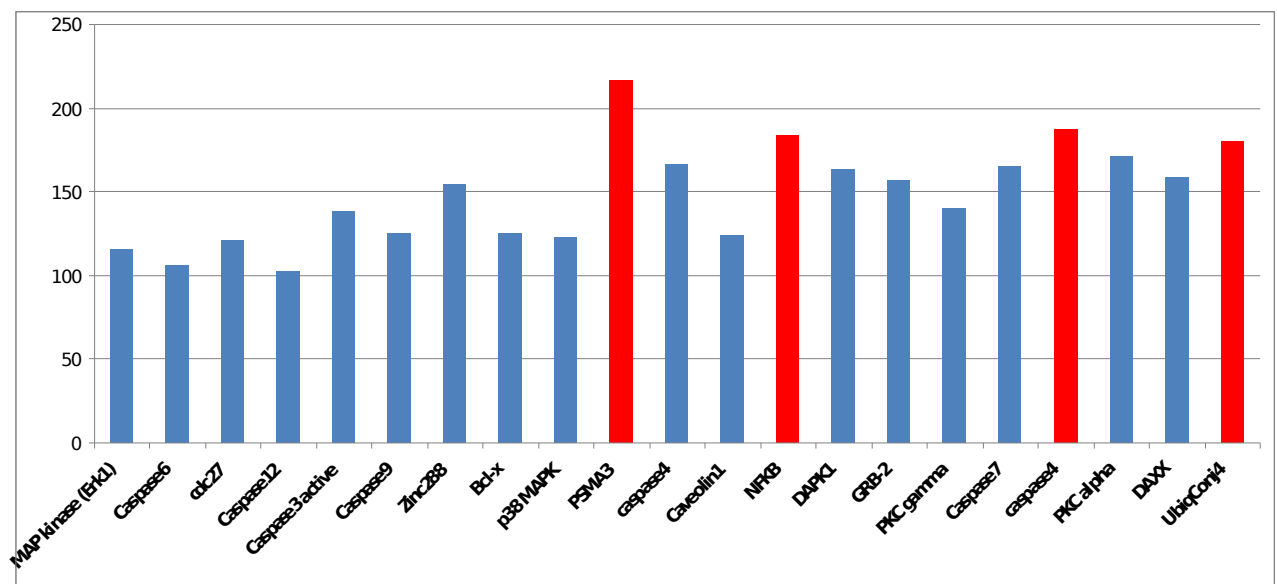


**3. ábra** Szívmuscle-elhalás (apoptózis) kimutatása doxorubicinnel (25 mg/kg ip.) kezelt egerek szívében Tunel-festéssel. Vad típusu egerek (WT), hsp27 transzgenikus egerek (TG). A nyilak az elhalt szívmusclesejtek csoportját jelzik.

**Vizsgálatainknak kiemelkedő jelentősége lehet a daganatok gyógykezelésében, lehetővé téve a doxorubicin kiterjedt alkalmazását. Amennyiben a doxorubicinnel**

együtt olyan kismolekulasúlyú molekulákat juttatunk be a szervezetbe, amelyek az endogén hsp fehérjék expresszióját indukálják (ún. hsp inducerek), akkor a doxorubicin szívre gyakorolt káros hatása kivédhető és a szer emelt terápiás dózisban alkalmazható.

A második periódusban azt vizsgáltuk, hogy milyen hatással lehet a hsp27 fehérje túltermelése más gének kifejeződésére a szívizomszövetben. Összesen 21 gén expresszióját vizsgáltuk kvantitativ real-time PCR (Q-PCR) módszerrel. A transzgenikus szívizom szövetben a legnagyobb mértékben a proteasome subunit  $\alpha$  type3 (PSMA3) (216%), a caspase 4 (187%), az NF $\kappa$ B (183%), és az ubiquitin conjugase 4 (180%) gén expressziója növekedett meg. Kisebb mértékű emelkedést találtunk a PKC  $\alpha$  (171%), caspase 7 (165%), DAPK1 (163%), DAXX (158%) és a GRB 2 (157%) gének kifejeződésében (4. ábra).



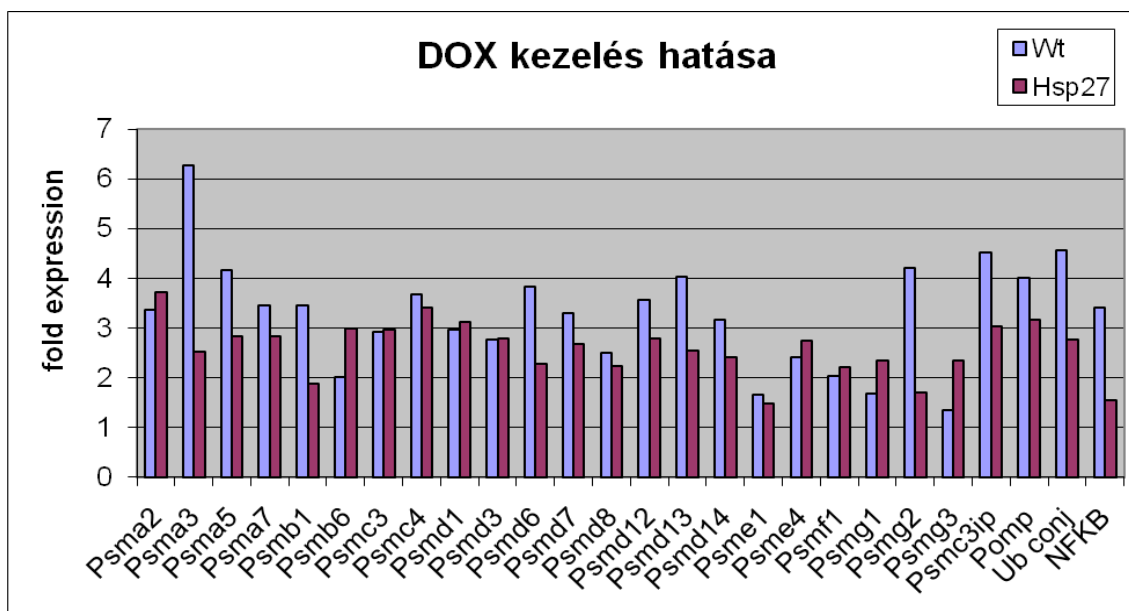
**4. ábra** Génexpresszió-vizsgálat hsp27 transzgenikus egerek szívéből kvantitativ real-time PCR módszerrel.

Ezen eredmények közül a proteasome subunit  $\alpha$  type3 és az ubiquitin conjugase 4 aktiválódása különösen érdekes, hiszen sejten belül a proteasome proteáz rendszer a felelős a rövid életidejű és a megfelelő strukturájukat felvenni képtelen ún. unfolded proteinek ubiquitinilációjáért és az ezt követő lebontásáért. Az ubiquitin-proteasome

rendszer és hsp fehérjék hősokk hatásra bekövetkező parallel indukcióját már korábban is megfigyelték (Schmid et al. 2008). Parcellier és mtsai. kimutatták, hogy a hsp27 kötődik a 26S proteasoma komplexhez és elősegíti a multiubiquitinilált fehérjék lebontását (Parcellier et al. 2006). Az NF $\kappa$ B egy transzkripció faktor és szerepe van a sejtek növekedésében, a gyulladásos reakciókban és a stressz válaszában. A hsp27 megnöveli az NF $\kappa$ B aktivitását oly módon, hogy elősegíti az NF $\kappa$ B működését gátló I- $\kappa$ B fehérje proteasomális lebontását (Parcellier et al. 2003). Az NF $\kappa$ B ezután képes lesz a magba jutni és mint transzkripció faktor továbblendíteni a sejtciklust és beindítani a sejt további szaporodását. A DAXX fehérje egy apoptózis- modulátor fehérje, amely a magban lokalizálódik és transzkripció faktorok (pl. az NF $\kappa$ B családhoz tartozó RelB!) működését szabályozza. A szabályozás módja: DNS metyláció útján történő génlecsendesítés (silencing) és nemcsak a RelB gén működését, hanem annak target-génjeinek (pl. DAPK1) a működését is érinti, azaz azok működését is gátolja (Puto et al.2008). A Grb2, közismert citoplazmatikus adaptor molekula, amelyet receptor tirozin kinázok (RTKs) reaktiválnak és amelyek a sejtszaporodásban és növekedésben szerepet játszó Ras és phosphatidylinositol 3' kinase jelátviteli utak fontos közvetítői (Li et al. 1993).

Korábban azt is kimutatták, hogy a hsp27 kötődik a mitokondriumokból a citoplazmába kiszabaduló cytochrome c molekulával és ezzel megakadályozza a caspase fehérjék aktivációját és a sejtek apoptózisát (Paul et al. 2002, és Samali et al. 2001).

A következőkben a doxorubicin vad-típusú és transzgenikus állatokra gyakorolt hatását vizsgáltuk Q-PCR technikával, mostmár célzottan a proteasoma-rendszer alkotóinak változására fókuszálva **(5. ábra)**.



**5.ábra.** Doxorubicin hatása a proteasoma-rendszer elemeire vad-típusú és transzgenikus egerek szívizom sejtjeiben. (Psma: alpha type subunit; Psmb: beta type subunit; Pmsc: ATPase subunit; Pmsd: non-ATPase subunit; Pmse és Psmf: proteasome activator subunit; Psmg: proteasome assembly chaperone; Pomp: proteasome maturation protein; Psmc3ip: Psmc3 interacting subunit).

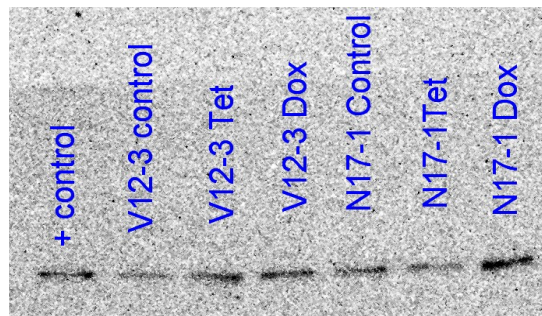
A doxorubicin elsősorban a vad-típusú egerek szívében idézett elő drasztikus génexpressziós változást; a Psma3 szintje mintegy 6-szorosára, a Psma5, Pmsd13, Psmg2 Psmc3ip, és az ubiquitin conjugase szintje több mint 4-szeresére emelkedett, jelezvén a sejtfehérjék aktiv degradációját és a sejtek fokozott elhalását (apoptózist). Ezzel szemben a hsp27 transzgenikus egerekben a proteasoma-rendszer ezen alegységeinek szintje csak mérsékelten (2-3 szorosára) emelkedett. Ezek a molekuláris eredmények messzemenően alátámasztják a hsp27 sejtvédő, anti-apoptotikus hatását, amelyet a 3. ábrán szövettanilag is kimutattunk.

Jelen pályázatunk két évre nyert támogatást. A következő években tovább szeretnénk vizsgálni a hsp27 fehérje sejtprotektív, anti-apoptotikus hatását; kapcsolatát a proteasoma- rendszer egyes tagjaival, szerepét a caspase-3 és caspase-9 aktivációjának

gátlásában. Különösen érdekes lehet a szivben indukált fehérjékkel (DAPK1, DAXX és a GRB 2) esetlegesen létrejövő interakciójának tanulmányozása.

Az emlős sejtek hőstresszválaszának tanulmányozása sokáig a magas hőmérsékleti tartományra korlátozódott. Napjainkban azonban egyre több adat utal arra, hogy a testhőmérséklet 1-2 °C –kal történő emelkedése is fontos(abb) fiziológiás változásokkal jár. A 40-43 °C-os hőmérséklet majdnem szelektíven pusztít bizonyos tumorokat, de a magas hőmérséklet gátolja a sejtciklust és serkenti az apoptózist. Az enyhe hő sokkról feltételezik, hogy pozitívan szabályozza a sejtciklust és a differenciációt a Ras szignáltranszdukciós útvonalon keresztül. Tekintettel arra, hogy a hő sokkfehérjék indukációjában kulcsszerepet játszik a HSF1, valamint a Rac1 plazmamembránba történő lokalizációja elengedhetetlen az általa befolyásolt jelátviteli folyamatok aktiválásához, megvizsgáltuk, a Rac1 milyen szerepet játszik a hő sokk válaszban.

1. E célból először a Rac1 domináns negatív (Rac1N17), valamint a konstitutívan aktív (Rac1V12) allélját klónoztuk pCDNA4/TO vektorba, ezáltal biztosítva az emlős sejtekben történő Tet on/off rendszer szabályozott expressziót. A két Rac1 konstrukciót az expressziót szabályozó pCDNA6/TR vektorral (1:6 arányban) transzfektáltuk (Fermentas Exgene 500). 10% FCS-t tartalmazó RPMI mediumban nőtt B16-F10 sejtekbe. A stabil sejtvonalakat 75 µg/ml of zeocin + 8 µg/ml of blaszticidin tartottuk fenn. A különböző Rac1 mutánsok expresszióját Western-blottal ellenőriztük. Számos blaszticidin és zeocin rezisztens klónt ellenőriztünk a Rac1 indukcióját tesztelendő de a legjobban expresszáló klónok is csak mintegy 40%-kal több fehérjét expresszáltak a kontrollhoz képest:

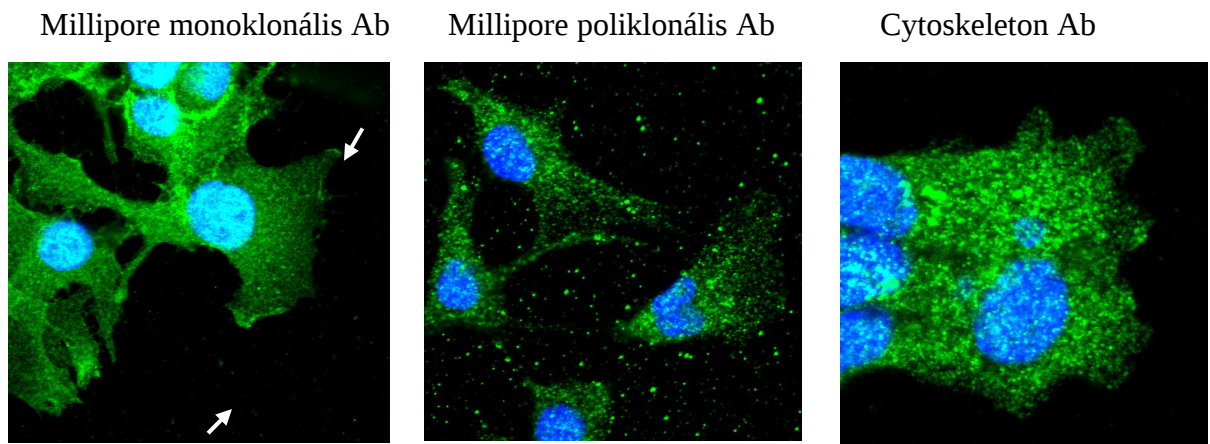




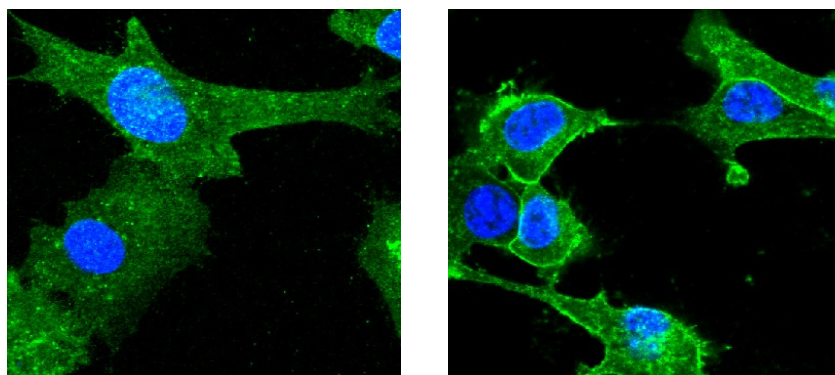
Alternatív módszerként megpróbálkozunk a transzpozon alapú (Sleeping Beauty) génbevitellel is.

2. Ismert tény, hogy Rho-GDI megakadályozza a Rac1 plazmamembránba történő transzlokációját azáltal, hogy a fehérje geranil-geranil-módosított oldalláncát “eltakarja”. Mivel a plazmamembránban (PM) jelenlévő Rac1 képes elindítani a jelátviteli útvonalat, megpróbáltuk kimutatni a PM-lokalizált Rac1 fehérjét különböző fixálási módszerekkel, a jelenleg hozzáférhető ellenanyagokkal.

A legjobb eredményt Millipore monoklonális ellenanyagával kaptuk B16 sejteken (fehér nyíllal jelölve):

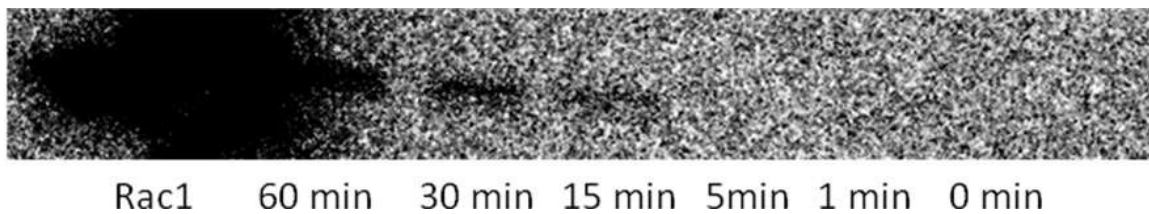


A továbbiakban kimutattuk, hogy a szérum megvonást követő visszaadás fokozza a Rac1 PM-lokalizációt:

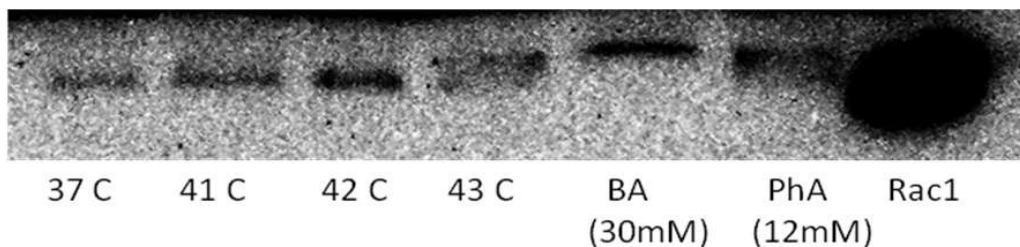




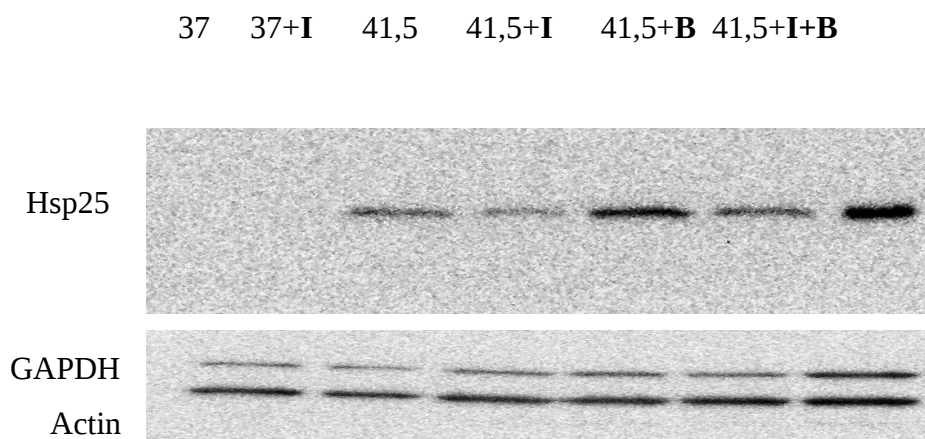
A szérumszűrés követő Rac1 relokalizációt Western-blottal is sikerült kimutatnunk. A kísérlet során a sejteket egy éjszakán át tartottuk szérumszűrés körülmények között, majd a szérumszűrés után különböző időpontokban plazmamembránt izoláltuk, s ellenőriztük a Rac1 fehérje jelenlétét. Amint az ábrán látható, a szérumszűrés követően már a 15. percen megtalálható a plazmamembránban:



A fentiek tükrében megvizsgáltuk, hogy a hőssok illetve a különböző membrán fizikai állapotát befolyásoló szerek (benzil-alkohol, BA, fenetil-alkohol, PhA) hogyan hatnak a Rac1 plazmamembrán lokalizációjára szérumszűrés mellett. A Western blot kísérletek tanúsága szerint a hőmérséklet emelése fokozta a PM-kötött Rac1 mennyiségét, csakúgy mint a két membránperturbens ágenssel történő kezelés. Érdekes módon a membránaktív szerekkel kezelt sejtekben detektált Rac1 molekulatömege eltért a hőssokolt mintákban kimutatottakhoz képest, ami felveti az esetleges poszt-transzlációs módosítás lehetőségét is:



A Rac1 HSP indukcióban betöltött szerepét vizsgálandó, megnéztük, hogyan reagálnak a sejtek egy Rac1 inhibitor (NSC23766, 100  $\mu$ M; 2órával a hősokk előtt adva, **I**), valamint a hősokk hatását HSP szinten fokozó szer (BGP-15, 10 $\mu$ M, közvetlenül a HS előtt adva, **B**) jelenlétére. A sejteket 1 órán keresztül hősokkoltuk 41,5 °C-on , majd médiumcsere után egy éjszakán át inkubáltuk (recovery).



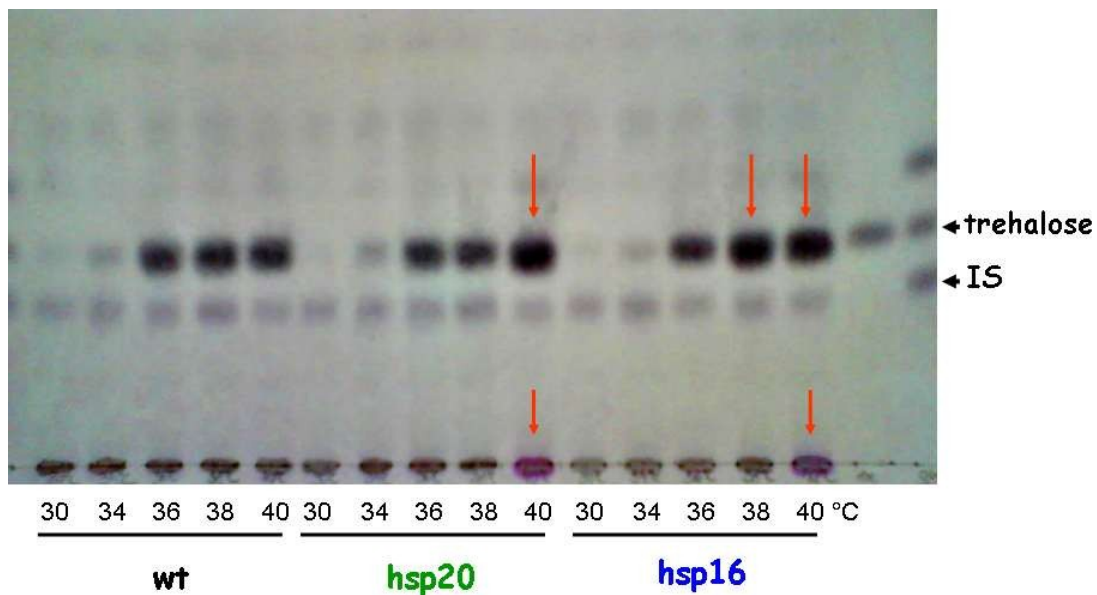
#### A *Schizosaccharomyces pombe* chaperone-deficiens mutánsok előállítása, jellemzése

A háromféle chaperone rendszer (HSP, trehalóz, lipidek) kölcsönhatásának tanulmányozására szolgáló *S. pombe* mutások előállítását -a várható membránfenotípus miatt- a két sHSP- (hsp16, ill. hsp20) deficiens mutánssal kezdtük. A széles körben használt, PCR alapú módszerek közül először az egyszerűbb, egylépéses, ún. “80-mer homológia” metódust próbáltuk ki, az *ura4* gént használva szelekciós markerként. Kísérleteink során kiderült, hogy ezen technika hatékonysága a célzott géneket illetően nem kielégítő, mert a mutagén konstrukció -a szelekción, valamint a stabilitásteszten átment jelöltek esetében -nem a célzott gének helyére épült be a genomiális Southern kísérleteink tanúsága szerint. Ezért a továbbiakban a komplikáltabb, kétlépéses “250-mer homológia” technikával próbálkoztunk. Viszonylagos bonyolultsága ellenére a módszer előnye, hogy a stabil mutáns-jelöltek a mutagenézishoz használt primerekkel végrehajtott genomiális PCR reakcióval előzetesen ellenőrizhetők, amennyiben a vad típusú gén és a

szelekciós marker (ura4) között méretkülönbség van. A hsp20-deficiens, stabilitásteszten átesett jelöltek között volt 3 PCR pozitív, amelyekről a genomiális Southern analízis során kiderítettük, hogy a mutagén konstrukció csak egy kópiában, a kívánt helyre épült be. A hsp16 mutánsok ugyanezen technikával történő előállítása során azonban több akadállyal is szembesültünk. Az első transzformálás során kapott stabil klónok között egy sem akadt, amely átment volna az előzetes genomiális PCR szűrőn, amennyiben mindegyik jelölt tartalmazta az intakt hsp16 génre jellemző fragmentet is. Vizsgálataink során kiderült, hogy a célgén 3' végének amplifikálásához használt egyik primer - nyilvánvaló szekvenciahomológia hiányában - önmagában is a várt fragmenttel megegyező méretű fals-pozitív reakcióterméket eredményez. Az inkriminált oligonukleotid helyett újat terveztünk, amely az ellenőrzések során megfelelőnek bizonyult. Az új primerrel amplifikált reakciótermék transzformálása során azonban meglehetősen kevés (a tesztelték 20%-a) klón bizonyult stabilnak, ami valószínűleg annak tudható be, hogy a célgénünk közel van a kromoszóma centromer régiójához. Mindezek ellenére sikerült két stabil, a mutáns konstrukciót megfelelő helyen tartalmazó hsp16-deficiens mutánst előállítani.

A két sHSP, valamint a kapott trehalóz deficiens (tps1) mutáns a fénymikroszkópos megfigyelések során nem mutatott nyilvánvaló morfológiai különbséget a vad típusú sejtekkel összehasonlítva. A magasabb hőmérsékleten történő növesztési kísérletek során kiderült, hogy a tps1 mutáns -másik kettővel és a wt sejtekkel ellentétben- képtelen növekedni 38 (+/-1) °C-on. Hősokk kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy mindkét sHSP mutáns érzékenyebb az azonnali letális hősokkra (50 °C, 15 min.) mint a wt sejtek, de jobban túlélnek, mint a kémiai chaperone-nak tartott trehalóz deficiens mutánsok. Amennyiben a sejteket a normális (30 °C) hőmérsékletnél magasabb (36 °C) hőmérsékleten inkubáltuk 1 órán át, majd ezután tettük ki letális hőstressznek, mindhárom mutáns fokozottabb túlélést mutatott a kontrol sejtekhez képest. E kísérletek azt igazolják, hogy önmagában egyik gén hiánya sem befolyásolja a szerzett termotoleranciát. A letális hőstressz alkalmazásával nyert adatok azonban felvetik annak a lehetőségét, hogy az sHSP mutánsok esetleg fokozott trehalóz szinttel próbálják kompenzálni ezen védőfehérjék hiányát.

Vékonyréteg-kromatográfiás (TLC) adataink arra utalnak, hogy az sHSP mutánsokban a trehalóz mennyisége megemelkedik a különböző hőmérsékleteken végrehajtott 1 órás hősokk során, mintegy kompenzálódó az sHSP-k hiányát. A 40 °C-os mintákban megjelenik egy új, valószínűleg szénhidrát-jellegű anyag is, amelyről jelenleg nem rendelkezünk érdemi információval.

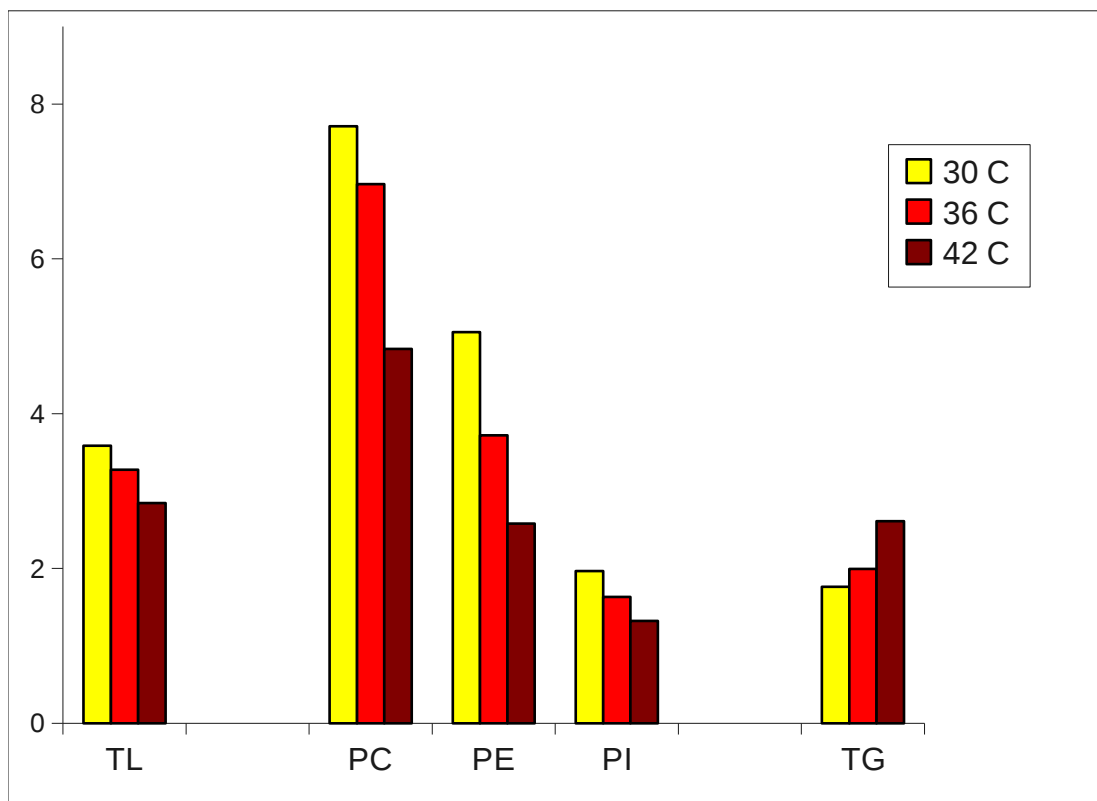


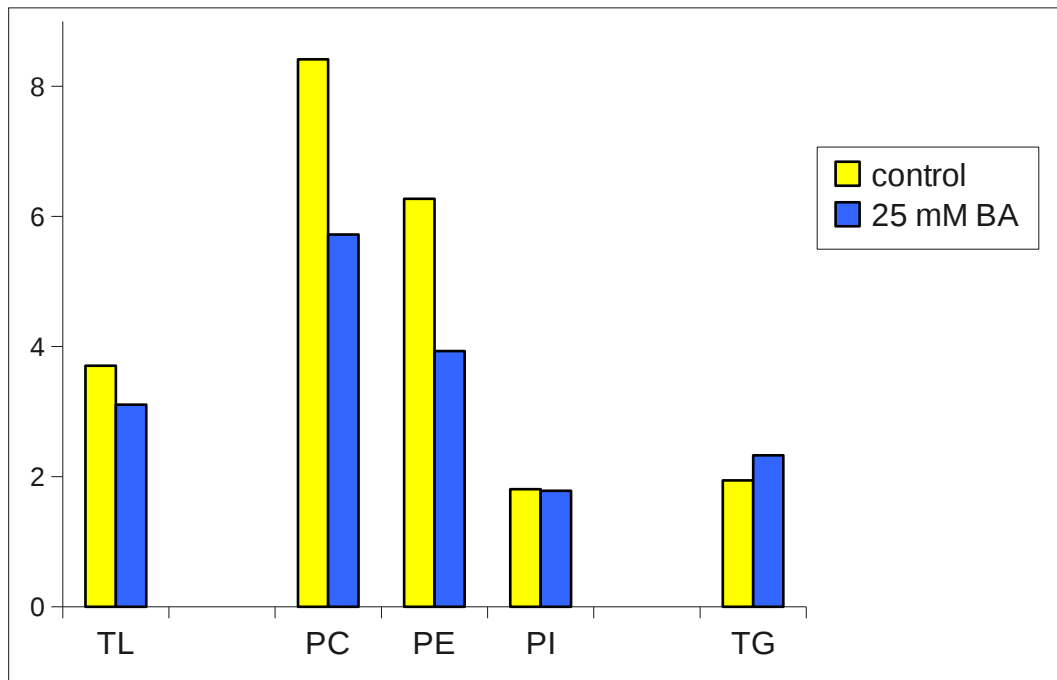
A TLC analízis során azonban nem sikerült kielégítően megoldani a trehalóz mennyiségének pontosabb, megbízhatóbb meghatározását, illetve az adatok megfelelő normálását. Ezért jelenleg más módszer (glükóz meghatározáson alapuló enzimatikus mérés) optimalizálásán dolgozunk. Mindezek mellett genetikai keresztezéssel (tetrádanalízis) előállítottuk a hsp16/tps1 illetve a hsp20/tps1 kettős mutánsokat, melyek vizsgálata jelenleg is folyik. Elkezdtük a hsp20/hsp16 kettős mutáns előállítását, a kapott 4 stabil, „PCR-pozitív” jelölt genomialis Southern analízise folyamatban van.

Lipidanalitikai vizsgálataink során optimalizáltuk a hatékony és reprodukálható sejtfeltárást, valamint a lipidextrakció módszerét. Lipidomikai metodikai fejlesztésünk részeként megoldottuk a lipidváltozások fehérjetartalomra történő normalizációját. Az így nyert adatokat összevetettük az irodalomban bevett szokásnak számító optikai

denzitásra, ill. szárazsúlyra történő normalizációval, és megállapítottuk, hogy a fehérjealapú módszer sokkal megbízhatóbb és reprodukálhatóbb adatokat szolgáltat.

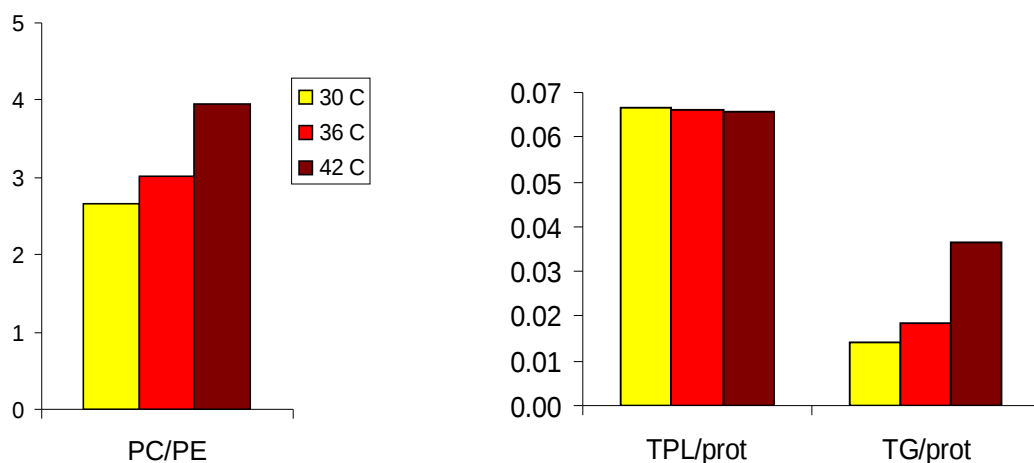
Azonosítottuk és kvantitatív módon meghatároztuk a hasadó élesztő főbb lipidosztályait, és azok zsírsavösszetételét. Megállapítottuk, hogy stresszkezelésekre (1 óra hősokk 36 és 42 °C, ill. a membránaktív benzil-alkohol, BA) a *S. pombe* jól karakterizálható lipidváltozásokkal válaszol. A hőmérséklet emelésére a membránlipidek zsírsavösszetétele a nagyobb telítettség (rigidebb szerkezet) irányába változott a homeoviszkozus adaptációnak megfelelően. Érdekes módon a trigliceridek zsírsavösszetétele - a membránalkotó lipidekkel szemben - a nagyobb telítetlenség irányába mozdult hőmérsékletfüggő módon. A telítetlenség mértékét jellemző "double bond index" (DBI) változásait foglalják össze az alábbi ábrák különböző stresszhatások esetén lipidosztályonkénti bontásban (TL: totál lipid, PC: foszfatidil-kolin, PE: foszfatidil-etanolamin, PI: foszfatidil-inozitol, TG: triglicerid).



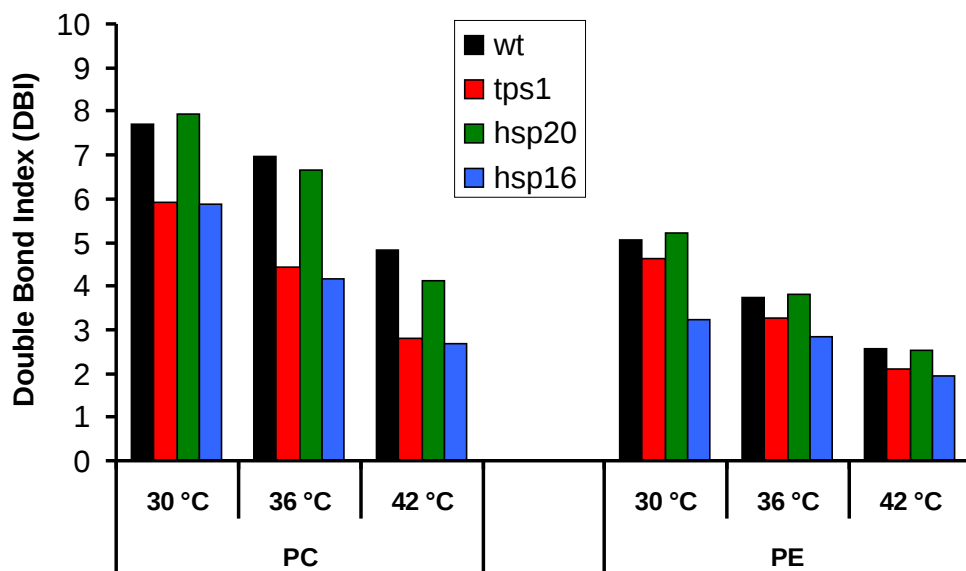


A membránstressz hatására az egyes lipidosztályok zsírsavösszetételében bekövetkező minőségi változásokon túl azok egymáshoz viszonyított, illetve fehérjére normált mennyisége is változott. A DBI változásaival párhuzamosan a két fő membránalkotó lipidosztály arányváltozása - a foszfatidil-kolin relatív mennyiségének növekedése és az ún. nem kettősrétegképző foszfatidil-etanolamin tartalom csökkenése - a membrán stabilizációját segíti elő fluidizációs stressz esetén. Abszolút mennyiségeket tekintve ugyanakkor a membránalkotó lipidek fehérjére normált össz mennyisége gyakorlatilag változatlan maradt 1 órás hőstressz hatására, jelezve, hogy a membrán az alkalmazott stressz körülmények között még képes volt maximálisan kompenzálni a stresszhatást. Mindezzel egyidejűleg a trigliceridek mennyisége többszörösére növekedett:





Érdekes előzetes eredményeket kaptunk a különböző mutánsok foszfatidil kolin ill. foszfatidil etanolamin telítettségének analízise során. Az 1 órán keresztül történő magasabb hőmérsékleten inkubált sejtekben mindkét lipidosztály telítetlensége -az elvárásoknak megfelelően- csökken, de ennek mértéke az egyes mutánsokban eltérő. A vad típusú, valamint a hsp20 mutáns sejtekben a PC lipidosztály DBI értéke mindhárom hőmérsékleten magasabb, mint a másik két mutánsban. E különbség azonban kevésbé érhető tetten a foszfatidil kolin (PE) esetében:



Jelenleg ezen izgalmas adatok reprodukálása folyik, s amennyiben a kettős sHSP mutáns (hsp16/20) is átmegy a végső molekuláris teszten (genomiális Southern) ezt a törzset is azonnal bevonjuk a vizsgálatokba, csakúgy mint a különböző trehalóz/sHSP kettős mutánsokat.

A felsorolt eredményekből még nem született publikáció, megítélésünk szerint azonban az adatok kellő számú reprodukció után az eredmények belátható időn belül (1-2 hónap) komoly szaklapban közölhetőek.

#### **Hivatkozások:**

Liu L, Zhang X, Qian B, Min X, Gao X, Li C, Cheng Y, Huang J. 2007. Over-expression of heat shock protein 27 attenuates doxorubicin-induced cardiac dysfunction in mice. Eur J Heart Fail. 2007 Aug;9(8):762-9.

Schmid K, Haslbeck M, Buchner J, Somoza V. 2008. Ann N Y AcadInduction of heat shock proteins and the proteasome system by casein-N epsilon-(carboxymethyl)lysine and N epsilon- (carboxymethyl)lysine in Caco-2 cells. Sci. 26:257-61.

Parcellier A, Brunet M, Schmitt E, Col E, Didelot C, Hammann A, Nakayama K, Nakayama KI, Khochbin S, Solary E, Garrido C. 2006. HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27Kip1 and helps S-phase re-entry in stressed cells. FASEB J. 20(8):1179-81.

Parcellier A, Schmitt E, Gurbuxani S, Seigneurin-Berny D, Pance A, Chantôme A, Plenchette S, Khochbin S, Solary E, Garrido C. 2003. HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. Mol Cell Biol.;23(16):5790-802.

Puto LA, Reed JC. 2008. Daxx represses RelB target promoters via DNA methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation. *Genes Dev.* 22(8):998-1010.

Li, N., Batzer, A., Daly, R., Yajnik, V., Skolnik, E., Chardin, P., Bar-Sagi, D., Margolis, B. & Schlessinger, J. (1993) *Nature* **363**, 85–88.

Paul, C., F. Manero, S. Gonin, C. Kretz-Remy, S. Viot, and A. P. Arrigo. 2002. Hsp27 as a negative regulator of cytochrome c release. *Mol. Cell. Biol.* 22:816–834.

Samali, A., J. D. Robertson, E. Peterson, F. Manero, L. van Zeijl, C. Paul, I. A. Cotgreave, A. P. Arrigo, and S. Orrenius. 2001. Hsp27 protects mitochondria of thermotolerant cells against apoptotic stimuli. *Cell Stress Chaperones* 6:49–58.